

Detecting and suppressing growth of malignant tumors and their metastases, comprises administration of coagulation factor Xa inhibitors

Publication number: DE10212555 (A1)

Publication date: 2003-09-25

Inventor(s): STUERZEBECHER JOERG [DE]; KRUEGER ACHIM [DE]; BANKE INGO JOERG [DE]; ARIT MATTHIAS JOERG ERWIN [DE]

Applicant(s): UNIV SCHILLER JENA [DE]; UNIV MUENCHEN TECH [DE]

Classification:

- **international:** A61K31/165; A61K31/165; (IPC1-7): A61K31/165

- **European:** A61K31/165

Application number: DE20021012555 20020315

Priority number(s): DE20021012555 20020315

Abstract of DE 10212555 (A1)

The use of coagulation factor Xa inhibitors (I) is claimed as active agents for detecting and suppressing the growth of malignant tumors and their metastases.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 102 12 555 A 1

⑯ Int. Cl.⁷:
A 61 K 31/165

DE 102 12 555 A 1

⑯ Aktenzeichen: 102 12 555.4
⑯ Anmeldetag: 15. 3. 2002
⑯ Offenlegungstag: 25. 9. 2003

⑯ Anmelder:

Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena, DE;
Technische Universität München, 80333 München,
DE

⑯ Erfinder:

Stürzebecher, Jörg, Dr.rer.nat.habil., 99094 Erfurt,
DE; Krüger, Achim, Dr.rer.nat. Dr.med.habil., 81541
München, DE; Banke, Ingo Jörg, 86836
Obermeitingen, DE; Arit, Matthias Jörg Erwin,
80992 München, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑯ Verwendung von Hemmstoffen des Gerinnungsfaktors Xa als Wirkstoffe zur Erkennung und Unterdrückung des Wachstums maligner Tumore sowie der von diesen ausgehenden Metastasierung
- ⑯ Aufgabe der Erfindung war es, ein neues Zielenzym zu benennen, dessen Hemmstoffe als neuartige Wirkstoffe mit möglichst geringen Nebenwirkungen und günstiger Bioverfügbarkeit für die Erkennung und Behandlung von malignen Tumoren geeignet sind. Überraschend wurde gefunden, dass Hemmstoffe des Gerinnungsfaktors Xa, beispielsweise Derivate des 4-Amidino-benzylamides, welches die Aminosäure D-Ser als t-Butylether enthalten, als Wirkstoff zur Diagnostik und Behandlung von malignen Tumoren sowie der von diesen ausgehenden Metastasierung eingesetzt werden können. Die Erfindung betrifft neue Wirkstoffe für medizinische Anwendungen bei der Krebserkennung und -bekämpfung.

DE 102 12 555 A 1

DE 102 12 555 A 1

Beschreibung

- [0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung von an sich bekannten Hemmstoffen des Gerinnungsfaktors Xa zur Erkennung und Unterdrückung des Wachstums maligner Tumore sowie der von diesen ausgehenden Metastasierung und damit als Wirkstoffe zur Diagnostik und Behandlung solcher Tumore.
- [0002] Die Ausbreitung und Metastasierung solider Tumoren in umgebendem Gewebe wird durch ihre Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix in der Umgebung der Tumorzelle abzubauen bzw. die Basalmembran zu durchdringen, ermöglicht. In diesem Prozess kommen Matrix-Metalloproteinasen, Cathepsine und dem Plasminogenaktivator/Plasminogen-System eine zentrale Bedeutung zu. So bewirkt der Plasminogenaktivator Urokinase die Aktivierung von Plasminogen; das entstehende Plasmin kann die Komponenten der extrazellulären Matrix (Fibrin, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane u. a.) abbauen sowie Metalloproteasen und pro-Urokinase aktivieren. Auch Cathepsine sind in die Aktivierung von Metalloproteasen eingebunden. Offenbar kommt dabei der Urokinase eine besondere Bedeutung zu, da sie an einen, an der Zelloberfläche lokalisierten, spezifischen Rezeptor (Urokinase-Rezeptor) binden kann, wodurch eine Verstärkung und Fokussierung der proteolytischen Aktivität in der direkten Umgebung der Tumorzelle erreicht wird. Sowohl in zellbiologischen Studien als auch in Tiermodellen konnte die Bedeutung der beteiligten Proteasen für Tumorwachstum und -ausbreitung gezeigt werden (P. Mignatti und D. B. Rifkin: *Physiol. Rev.* 73, 1993, 161–195; U. Reuning et al., *Int. J. Oncol.* 13, 1998, 893–906; A. Krüger et al.: *Cancer Gene Ther.* 7, 2000, 292–299.; V. Lutz et al.: *Biol. Chem.* 382, 2001, 789–798).
- [0003] Die Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems, die Matrix-Metalloproteininasen und die Cathepsine sind in den letzten Jahren in Hinsicht ihrer klinischen Relevanz für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht worden. Insbesondere der Gehalt von uPA im Gewebe verschiedener Tumoren erwies sich als ein Prognosefaktor (M. Schmitt et al.: *Thromb. Haemost.* 78, 1997, 285–296; R. W. Stephens et al.: *Breast Cancer Res. Treat.* 52, 1998, 99–111.). Aus diesen Befunden wurde davon ausgegangen, dass insbesondere synthetische Inhibitoren der Metalloproteininasen (P. D. Brown: *Expert Opin Investig Drugs.* 9, 2000, 2167–77) bzw. Urokinase (J. Stürzebecher et al.: *IDrugs* 4, 677–683, 2001) in der Lage sind, Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. So sind Hemmstoffe der Urokinase bekannt geworden (WO 01/06789), die sich von acyliertem Amidino-benzylamin ableiten und neben einer natürlichen Aminosäure in P2 einen D-Serin oder eine vergleichbare unnatürliche Aminosäure enthalten. Verbindungen diese Typs hemmen Urokinase ($K_i = 36 \text{ nM}$ für die wirksamste Verbindung) sehr deutlich.
- [0004] Auch für andere Proteasen liegen Beobachtungen vor, aus denen eine mögliche Beteiligung am Tumorwachstum und -ausbreitung hervor geht. So wurden in jüngster Zeit transmembranäre Trypsin-ähnliche Enzyme, wie Matriptase, beschrieben, die an bestimmte Tumorzellen assoziiert sind (Y. E. Shi et al.: *Cancer Res.* 53, 1993, 1409–1415; J. D. Hooper et al., *J. Biol. Chem.* 276, 2001, 857–860). Auch Thrombin wird eine mögliche Rolle bei Tumorausbreitung über eine Aktivierung des Thrombinrezeptors zugeschrieben (C. Rudroff et al.: *Eur. J. Surg. Oncol.* 27, 2001, 472–476). Offenbar besitzt auch Heparanase eine Bedeutung bei der Malignität von Lymphomen (L. Vlodavsky et al.: *Med Assoc J. 2 Suppl.* 2000, 37–45). Allerdings ist es bisher noch nicht gelungen, Hemmstoffe von Proteasen als Wirkstoffe in die Therapie einzuführen. Das liegt bei den bisher geprüften Inhibitoren von Metalloproteasen an der mangelnden Wirksamkeit der Verbindungen in vivo bzw. deren Nebenwirkungen (S. Zucker et al., *Oncogene* 19, 6642–6650, 2000; Krüger et al., *Cancer Res.* 61, 1272–1275, 2001). Bei den in dieser Hinsicht geprüften Urokinase-Hemmstoffen verhinderte die geringe Bioverfügbarkeit einen klinischen Einsatz (M. J. Towle et al.: *Cancer Res.* 53, 1993, 2553–2559; V. L. Nienaber et al.: *Structure* 8, 2000, 553–563; S. Y. Tamura et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 2000, 983–987). Deshalb wird weiter intensiv nach neuen Wirkstoffen bzw. anderen Zielenzymen gesucht.
- [0005] Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, ein neues Zielenzym zu benennen, dessen Hemmstoffe als neuartige Wirkstoffe mit möglichst geringen Nebenwirkungen und günstiger Bioverfügbarkeit für die Erkennung und Behandlung von malignen Tumoren geeignet sind.
- [0006] Überraschend wurde gefunden, dass Hemmstoffe des Gerinnungsfaktor Xa, beispielsweise Derivate des 4-Amidino-benzylamides, welche die t-Butylether der Aminosäure D-Ser enthalten, als Wirkstoffe zur Diagnostik und Behandlung von malignen Tumoren sowie der von diesen ausgehenden Metastasierung eingesetzt werden können. Beispielsweise wurde durch Anwendung dieser Wirkstoffe, die an sich als Faktor-Xa-Hemmstoffe bekannt sind, Ausbildung von Makro- und Mikrometastasen in einem T-Zell-Lymphom-Modell an der Maus wirksam mit in WO 01/96366 offenbarten Hemmstoffen für den Gerinnungsfaktor Xa unterdrückt.
- [0007] Vorteilhaft an der vorgeschlagenen Verwendung ist, dass die angegebenen Wirkstoffe, wie bekannt, den Faktor Xa hemmen sowie erfindungsgemäß über die Inaktivierung dieses Gerinnungsfaktors hinaus gleichzeitig als Wirkstoffe für die Erkennung sowie der antimetastatischen Behandlung von Patienten mit malignen Tumoren, beispielsweise zur Herstellung entsprechender oral, subkutan, intravenös bzw. transdermal verabreichbarer Arzneimittel einsetzbar sind.
- [0008] Es hat sich gezeigt, dass Faktor-Xa-Hemmstoffe im Vergleich zu bekannten antimetastatisch wirkenden Inhibitoren für andere Enzyme nicht nur, u. a. zur bioverträglichen Behandlung mit möglichst geringen Nebenwirkungen etc., eine bloße Alternative bieten, sondern es hat sich in Tierversuchen sogar herausgestellt, dass Hemmstoffe für den Gerinnungsfaktor Xa als neu gefundenes Zielenzym eine wesentlich stärkere Wirkung bei der Verhinderung von Tumorwachstum und Metastasierung entfalten.
- [0009] Ein besonders wirksamen Hemmstoff bildet dabei Amidinobenzylamin, wenn die Amidinogruppe in 4-Position steht, als Aminosäuren Glycin und D-Serin-t-butylether gebunden sind und wenn die Verbindung eine N-terminale Schutzgruppe aus einem Aryl- bzw. Aralkyl-sulfonyl-Rest aufweist.
- [0010] Die Wirkungen für die erfindungsgemäße Verwendung der Faktor-Xa-Hemmstoffe wurden insbesondere für das Benzylsulfonyl-D-Ser(t-butyl)-Gly-4-Amidinobenzylamid nachgewiesen.
- [0011] Die Erfindung soll nachstehend anhand des Inhibitors Benzylsulfonyl-D-Ser(t-butyl)-Gly-4-Amidinobenzylamid als Ausführungsbeispiel näher erläutert werden. Dieser wird in seiner bei Tierversuchen erhaltenen Wirkung mit herkömmlichen Urokinase-Hemmstoffen verglichen.
- [0012] Die Figur zeigt als Auswertung der besagten Tierversuche eine diagrammatische Gegenüberstellung der einzel-

DE 102 12 555 A 1

nen Hemmwirkungen auf die Bildung von Makrometastasen.

Beschreibung der eingesetzten Hemmstoffe

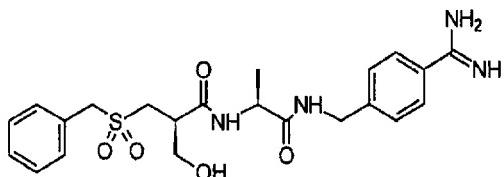
[0013] Die untersuchten Hemmstoffe sind Derivate des 4-Amidinobenzylamids und sind hinreichend als Inhibitoren der Urokinase (S. Künzel et al.: Bioorg. Med. Letters 12, 2002, 645–648) bzw. des Gerinnungsfaktors Xa (WO 01/96366) bekannt. Die eingesetzten Derivate haben folgende Struktur:

Inhibitor 1

10

Urokinase-Hemmstoff

Benzylsulfonyl-D-Ser-Ala-4-Amidinobenzylamid



15

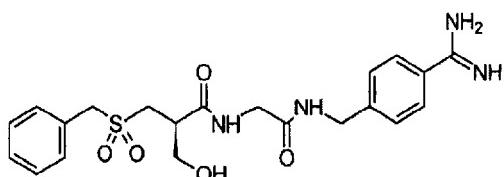
Inhibitor 2

20

Urokinase-Hemmstoff

25

Benzylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-Amidinobenzylamid



30

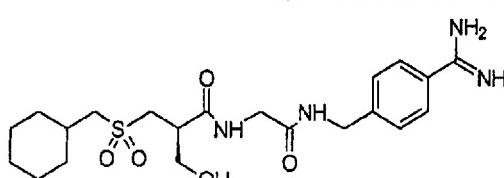
Inhibitor 3

35

Urokinase-Hemmstoff

40

Cyclohexylmethylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-Amidinobenzylamid



45

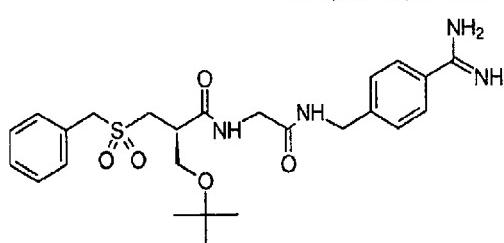
Inhibitor 4

50

Faktor-Xa-Hemmstoff

55

Benzylsulfonyl-D-Ser(t-butyl)-Gly-4-Amidinobenzylamid



60

65

[0014] Die Untersuchungsergebnisse zur Hemmung des Gerinnungsfaktors Xa und verwandter Enzyme durch die vorgenannten vier Inhibitoren sind in nachfolgender Tabelle zusammengestellt.

DE 102 12 555 A 1

Tabelle

Hemmung des Gerinnungsfaktors Xa und verwandter Enzyme

5 Hemmstoff Nr.	K _i , µM		
	Urokinase	Thrombin	Faktor Xa
10 1	0.0077	0.11	2.1
15 2	0.036	13	3.0
20 3	0.048	10	2.0
4	1.2	0.22	0.030

Bestimmung der Hemmwirkung

25 [0015] Die Bestimmung der Hemmwirkung wurde in Tris-Puffer pH 8,0 unter Einsatz synthetischer Peptidsubstrate bei 25°C (siehe J. Stürzebecher et al.: Bioorg. Med. Letters 9, 1999, 3147–3152) durchgeführt und nach Dixon (Biochem. J. 55, 1953, 170–171,) durch lineare Regression rechentechnisch ermittelt.

Einfluss der genannten Inhibitoren auf die Bildung von Makrometastasen

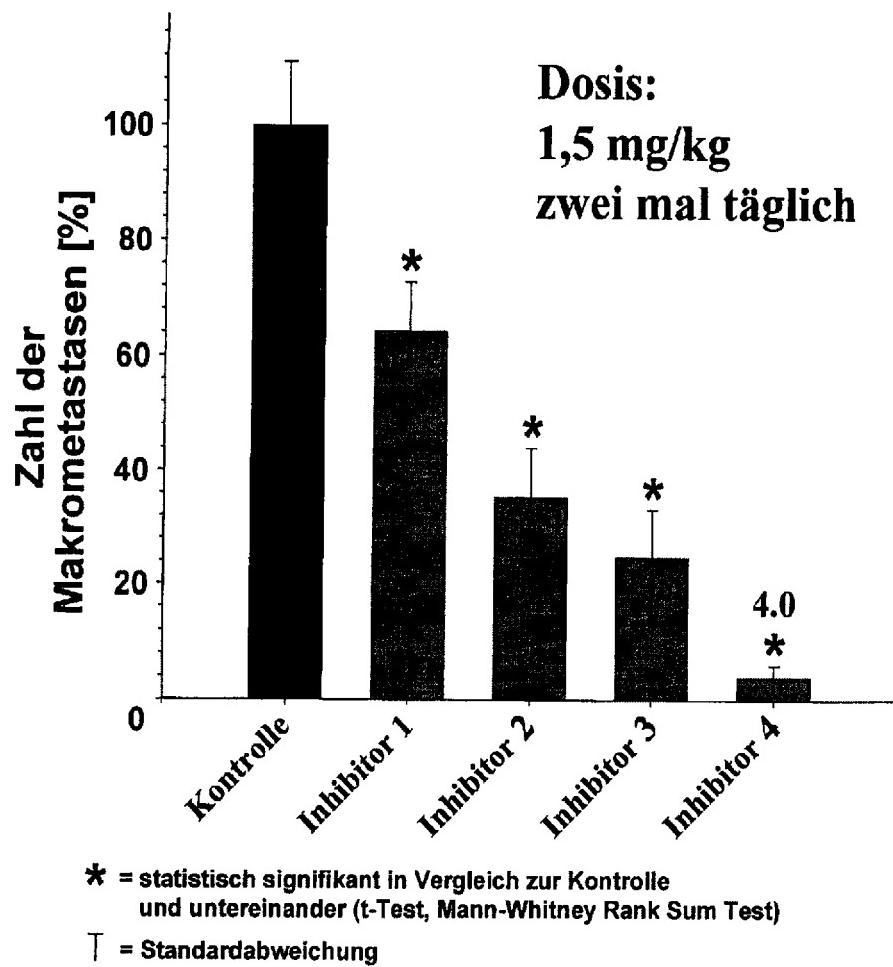
30 [0016] Die Wirkung bei der Verwendung der in der Tabelle aufgeführten Inhibitoren 1 bis 4 auf die Bildung von Makrometastasen wurde in Tierversuchen nachgewiesen:
Dafür wurden in die Schwanzvene von pathogen-freien, weiblichen DBA/2 Mäusen (6–8 Wochen alt; Charles River, Sulzfeld) 5,000 DBA/2-syngenen lacZ-markierten L-Cl.5s Lymphomzellen inkokuliert. Sechs Tage danach, als Makrometastasen (> 0.2 mm) deutlich sichtbar waren, wurden die Mäuse getötet, die Lebern herauspräpariert und diese mit X-Gal (Roche-Diagnostics, Penzberg) gefärbt. Darauf hin wurden die blauen makrometastatischen Foci auf der Leberoberfläche gezählt. Mit dieser Methode ist es möglich, das Metastasenmuster der Lymphomzellen zu bestimmen.
[0017] Die Inhibitoren wurden jeweils in 5% Ethanollösung resuspendiert und intraperitoneal appliziert, in einem ersten Experiment bei einer täglichen Dosis von 1 mg/kg und in einem weiteren Experiment zweimal täglich 1,5 mg/kg, und zwar ab dem Tag vor der Tumorzellinokulation.
40 [0018] Die Ergebnisse, d. h. die Wirkungen der einzelnen Inhibitoren auf die besagte Bildung der Makrometastasen beim letztgenannten Experiment mit der täglich zweimaligen Applikation der Dosis von 1,5 mg/kg, sind im Diagramm der Zeichnung dargestellt. Es konnte mit dem zur erfundungsgemäßen Verwendung vorgeschlagenen Faktor-Xa-Hemmstoff (Inhibitor 4) eine wesentliche höhere antimetastatische Wirkung erzielt werden als mit den an sich bekannten Urokinase-Hemmstoffen (Inhibitoren 1 bis 3).

45 Patentansprüche

1. Verwendung von Hemmstoffen des Gerinnungsfaktors Xa als Wirkstoff zur Erkennung und Unterdrückung des Wachstums maligner Tumore sowie der von diesen ausgehenden Metastasierung.
- 50 2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Hemmstoffe des Gerinnungsfaktors Xa Derivate des 4-Amidino-benzylamides zum Einsatz kommen, welche die Aminosäure D-Ser alt Ether enthalten.
3. Verwendung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Hemmstoff des Gerinnungsfaktors Xa Benzylsulfonyl-D-Ser(-butyl)-Gly-4-Amidinobenzylamid eingesetzt wird.
4. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Hemmstoffe des Gerinnungsfaktors Xa als Wirkstoffe zur Herstellung von oral, subkutan, intravenös bzw. transdermal verabreichbaren Arzneimitteln zur Behandlung von Tumoren eingesetzt werden.
- 55 5. Verwendung gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Hemmstoffe des Gerinnungsfaktors Xa als Arzneimittel in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder Pflaster etc. eingesetzt werden.
6. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Hemmstoffe des Gerinnungsfaktors Xa als diagnostisches Mittel zur Tumoruntersuchung zum Einsatz kommen.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



Figur